



酸性木聚糖酶（ACX）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2600

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
缓冲液	液体 75mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 25 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

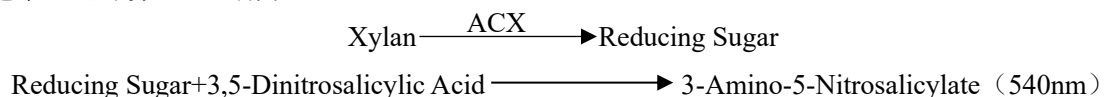
溶液的配制：

- 1、标准品：10mg 木糖。临用前加入 667 μ L 缓冲液配成 100 μ mol/mL 的标准品溶液，2-8°C保存 8 周。

产品说明：

木聚糖酶(EC 3.2.1.8)主要由微生物产生，能催化水解木聚糖，也被称为戊聚糖酶或半纤维素酶，可分解酿造或饲料工业中的原料细胞壁以及 β -葡聚糖，降低酿造中物料的粘度，促进有效物质的释放，以及降低饲料中的非淀粉多糖，促进营养物质的吸收利用，因而广泛的应用于酿造和饲料工业中，酸性木聚糖（ACX）一般分离自耐酸的真菌，细菌及部分霉菌。

ACX 在酸性环境下能将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，进一步在沸水浴条件下与 3,5-二硝基水杨酸发生显色反应，在 540nm 处有特征吸收峰，反应液颜色的深浅与酶解产生的还原糖量成正比，通过测定反应液在 540nm 吸光值增加速率，可计算 ACX 活力。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、恒温水浴锅、可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、可调式移液枪、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 发酵液：发酵液于 8000rpm，4°C，离心 15min，取上清，置冰上作为待测样本。
2. 酶干粉：称 1mg，加 1mL 缓冲液溶解，置冰上待测。
3. 组织样本：称 0.1g 组织，加入 1mL 缓冲液，冰上充分研磨。8000rpm，4°C，离心 15min，取上清置冰上待测。

注：含还原糖较高的样本（如植物果实等）可用蒸馏水进行适当稀释后再进行测定。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度预热30min 以上，调节波长至540nm，蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释：临用前按下表将标准品稀释为3、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液待测。

序号	稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	标准品体积 (μL)	缓冲液体积 (μL)	稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
1	100	100	900	10
2	10	150	350	3
3	10	100	400	2
4	10	100	900	1
5	1	500	500	0.5
6	0.5	500	500	0.25
7	0.25	500	500	0.125
8	0.125	500	500	0.0625

备注：实验中每管需要200 μL 。

- 3、样本测定：（在EP管中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	空白管	标准管
样本	200	200	-	-
标准品	-	-	-	200
缓冲液	300	300	500	300
试剂一	-	200	200	200
混匀，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应30min，立即沸水浴中10min灭活。（注意不要让盖子爆开，以免进水，改变反应体系）				
试剂一	200	-	-	-
试剂二	300	300	300	300
试剂三	100	100	100	100
混匀，沸水浴中显色5min（注意不要让盖子爆开，以免进水改变了反应体系），冷却后尽快测定各管540nm下的吸光度，分别记为A测定、A对照、A空白、A标准，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。空白管和标准曲线只需做1-2次。				

三、ACX活性计算

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ （y， $\Delta A_{\text{标准}}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ （y， $\Delta A_{\text{测定}}$ ）带入公式计算样本浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）。

2. 发酵液 ACX 活力计算：

酶活定义：50 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 4.8 条件下每毫升发酵液每分钟分解木聚糖产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/mL)} = x \div T \times F = x \div 30 \times F$$

3. 酶干粉 ACX 活力计算：

酶活定义：50 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 4.8 条件下每毫克酶干粉每分钟分解木聚糖产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/mg)} = x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times W_1 \div V_{\text{提取}}) \div T \times F = x \div W_1 \div 30 \times F$$

4. 组织中 ACX 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 50°C, pH 4.8 条件下每毫克蛋白每分钟分解木聚糖产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T \times F = x \div \text{Cpr} \div 30 \times F$$

(2) 按样本质量计算:

酶活定义: 50°C, pH 4.8 条件下每克组织每分钟分解木聚糖产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times W_2 \div V_{\text{提取}}) \div T \times F = x \div W_2 \div 30 \times F$$

V 样本: 加入的样本体积, 0.2mL; W₁: 酶干粉的质量, mg; T: 反应时间, 30min; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W₂: 组织样本质量, g; V 提取: 加入缓冲液的体积, 1mL; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

吸光度变化应该控制在 0.01~1.2 之间, 否则加大样本量或稀释样本, 注意同步修改计算公式中的稀释倍数。

实验实例:

1、取 0.1079g 蓝莓加入 1mL 缓冲液进行匀浆研磨, 取上清用蒸馏水稀释 40 倍后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.717-0.581=0.136, 带入标曲 $y=0.413x-0.0233$ ($R^2=0.9993$), 计算 $x=0.386$, 按样本质量计算 ACX 活性得:

$$\text{ACX 活力 (U/g 质量)} = x \div W \div 30 \times F = 0.386 \div 0.1079 \div 30 \times 40 = 4.770 \text{ U/g 质量。}$$

2、取泡菜汁离心取上清按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.639-0.392=0.247, 带入标曲 $y=0.413x-0.0233$ ($R^2=0.9993$), 计算 $x=0.654$, 按发酵液计算 ACX 活力得:

$$\text{ACX 活力 (U/mL)} = x \div T \times F = 0.654 \div 30 \times 1 = 0.022 \text{ U/mL。}$$

相关系列产品:

BC2590/BC2595 中性木聚糖酶 (NEX) 活性检测试剂盒

BC3610/BC3615 碱性木聚糖酶 (BAX) 活性检测试剂盒